

# Nederlandsch Octrooibureau

AAAA 1111

Certified Netherlands translation of a European Patent (Art 65 EPC)

Octrooigemachtigden  
European Patent Attorneys

Merken- & Modellen-  
gemachtigden  
Trademark Design  
Attorneys

Patent number	0784674
Patentee	Novozymes A/S
Application filed on	26 October 1995
Application number	95934621.4
Patent mentioned in European Patent Bulletin	4 September 2002
Patent will expire on	26 October 2015
Annuities for maintaining the patent will be due on	31 October

---

Filing date of certified Netherlands translation	4 December 2002
---	-----------------

BEST AVAILABLE COPY

P12700-021

Correspondentie / Correspondence  
Postbus 29720 / P.O. Box 29720  
2502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague  
The Netherlands  
E-mail: info@octrooibureau.nl  
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag  
Scheveningsweg 82 2517 KZ Den Haag  
Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28  
Bureau Wageningen  
Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen  
Tel: +31 (0)317 479 790

Het Nederlandsch Octrooibureau  
is een maatschap die bestaat uit  
beroepsvennootschappen. Iedere  
aansprakelijkheid is beperkt tot het  
bedrag dat in het desbetreffende geval  
onder onze beroepsaansprakelijkheids-  
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is  
a partnership of professional  
corporations. Any liability shall  
be limited to the amount which  
is paid out under the firm's  
professional liability policy  
in the matter concerned.

NZAS-0020698

28

# Nederlandsch Octrooibureau

AAAA 1999

Octrooigemachtigden  
European Patent Attorneys

Merken- & Modellen-  
gemachtigden  
Trademark Design  
Attorneys

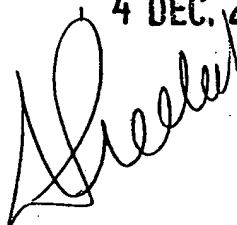
## VERKLARING

=====

Ondergetekende, *A.A.P. Meel*  
ingeschreven in het Register van Octrooigemachtigden  
bedoeld in Artikel 3 van het Octrooigemachtigdenreglement  
betreffende het optreden als gemachtigde voor de Octrooi-  
raad, verklaart hierbij dat de aangehechte vertaling naar  
zijn beste weten een volledige en getrouwe vertaling is  
van de tekst van het Europese octrooischrift nr.  
O 784 674 (B1).

's-Gravenhage,

4 DEC. 2002



BEST AVAILABLE COPY

Correspondentie / Correspondence  
Postbus 29720 / P.O. Box 29720  
2502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague  
The Netherlands  
E-mail: [info@octrooibureau.nl](mailto:info@octrooibureau.nl)  
[www.octrooibureau.nl](http://www.octrooibureau.nl)

Bureau Den Haag  
Scheveningseweg 82 2517 KZ Den Haag  
Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28  
Bureau Wageningen  
Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen  
Tel: +31 (0)317 479 790

Het Nederlandsch Octrooibureau  
is een maatschap die bestaat uit  
beroepsvennootschappen. Iedere  
aansprakelijkheid is beperkt tot het  
bedrag dat in het desbetreffende geval  
onder onze beroepsaansprakelijkheids-  
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is  
a partnership of professional  
corporations. Any liability shall  
be limited to the amount which  
is paid out under the firm's  
professional liability policy  
in the matter concerned.

NZAS-0020699

T052802

1

Publicatienummer: 0 784 674 B1

Octrooihouder: Novozymes A/S

## NIEUW LIPOLYTISCH ENZYM

5

### Beschrijving

### Technisch gebied

- 10 [0001] De onderhavige uitvinding heeft betrekking op nieuwe lipolytische enzymen. Meer in het bijzonder voorziet de onderhavige uitvinding in nieuwe lipolytische enzymen die zijn afgeleid van *Fusarium culmorum*.
- [0002] Lipolytische enzymen vinden veel industriële toepassingen. Alkalische lipases zijn van bijzonder belang voor gebruik in detergens samenstellingen.
- 15 [0003] Alkalische lipases van microbiële oorsprong zijn beschreven, waaronder lipases die zijn verkregen uit *Fusarium*. Lipases die zijn verkregen uit *Fusarium culmorum* zijn niet beschreven.

### SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

20

- [0004] Het is een doel van de onderhavige uitvinding om te voorzien in nieuwe alkalische lipolytische enzymen (EC 3.1.1.3).
- [0005] Overeenkomstig voorziet de onderhavige uitvinding in een eerste aspect in een lipolytisch enzym afgeleid van *Fusarium culmorum*.
- 25 [0006] Het enzym heeft een pH optimum in het bereik van ongeveer 7 tot ongeveer 9, meer in het bijzonder ongeveer pH 8, indien bepaald bij 30 °C met tributyrine als substraat.
- [0007] Het enzym heeft de volgende N-terminale aminozuur sequentie (cf. SEQ ID NO:1):

30

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-  
Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0020700

[0008] In zijn tweede aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor de bereiding van het lipolytische enzym, welke werkwijze het kweken omvat van een lipaseproducerende stam van *Fusarium culmorum* in een geschikt voedingsmedium, welk koolstof en stikstofbronnen en andere anorganische zouten bevat, gevolgd door het winnen van het lipolytische enzym.

[0009] In zijn derde aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor de bereiding van het lipolytische enzym, welke werkwijze het isoleren omvat van een DNA fragment, welk codeert voor het lipolytische enzym; het combineren van het DNA fragment met een geschikt expressiesignaal in een geschikte plasmidevector; het introduceren van de plasmidevector in een geschikte gastheer, ofwel als een autonoom replicerend plasmide of geïntegreerd in het chromosoom; het kweken van het gastheer organisme onder omstandigheden die leiden tot de expressie van het lipolytische enzym; en het winnen van het enzym uit het kweekmedium.

[0010] In verdere aspecten voorziet de onderhavige uitvinding in detergens samenstellingen, evenals detergens toevoegingen, omvattend het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding.

[0011] Tenslotte voorziet de onderhavige uitvinding in een biologisch zuivere kweek van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

## 20 GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

### Het micro-organisme

[0012] De onderhavige uitvinding voorziet in lipolytische enzymen afgeleid van een stam van de schimmel *Fusarium culmorum*. *Fusarium culmorum* is een bekende soort en stammen van *Fusarium culmorum* zijn gedeponereerd en zijn algemeen verkrijgbaar bij deponer instituten, b.v. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (GmbH (DSM), Duitsland en American Type Culture Collection (ATCC), U.S.A.

[0013] Bij een voorkeursuitvoeringsvorm voorziet de onderhavige uitvinding in een lipolytisch enzym afgeleid van de stam *Fusarium culmorum* DSM 1094, *Fusarium culmorum* DSM 62184, *Fusarium culmorum* DSM 62188, *Fusarium culmorum* DSM 62191, *Fusarium culmorum* DSM 62223, *Fusarium culmorum*

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

[0008] In zijn tweede aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor de bereiding van het lipolytische enzym, welke werkwijze het kweken omvat van een lipaseproducerende stam van *Fusarium culmorum* in een geschikt voedingsmedium, welk koolstof en stikstofbronnen en andere anorganische zouten bevat, gevolgd door het winnen van het lipolytische enzym.

[0009] In zijn derde aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor de bereiding van het lipolytische enzym, welke werkwijze het isoleren omvat van een DNA fragment, welk codeert voor het lipolytische enzym; het combineren van het DNA fragment met een geschikt expressiesignaal in een geschikte plasmidevector; het introduceren van de plasmidevector in een geschikte gastheer, ofwel als een autonoom replicerend plasmide of geïntegreerd in het chromosoom; het kweken van het gastheer organisme onder omstandigheden die leiden tot de expressie van het lipolytische enzym; en het winnen van het enzym uit het kweekmedium.

[0010] In verdere aspecten voorziet de onderhavige uitvinding in detergens samenstellingen, evenals detergens toevoegingen, omvattend het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding.

[0011] Tenslotte voorziet de onderhavige uitvinding in een biologisch zuivere kweek van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

## 20 GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

### Het micro-organisme

[0012] De onderhavige uitvinding voorziet in lipolytische enzymen afgeleid van een stam van de schimmel *Fusarium culmorum*. *Fusarium culmorum* is een bekende soort en stammen van *Fusarium culmorum* zijn gedeponeerd en zijn algemeen verkrijgbaar bij deponer instituten, b.v. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (GmbH (DSM), Duitsland en American Type Culture Collection (ATCC), U.S.A.

[0013] Bij een voorkeursuitvoeringsvorm voorziet de onderhavige uitvinding in een lipolytisch enzym afgeleid van de stam *Fusarium culmorum* DSM 1094, *Fusarium culmorum* DSM *Fusarium culmorum* 62184, *Fusarium culmorum* DSM 62188, *Fusarium culmorum* DSM 62191, *Fusarium culmorum* DSM 62223, *Fusarium culmorum*

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

ATCC 12656, *Fusarium culmorum* ATCC 15620, *Fusarium culmorum* ATCC 16430, *Fusarium culmorum* ATCC 16551, *Fusarium culmorum* ATCC 26556, *Fusarium culmorum* ATCC 34910, *Fusarium culmorum* ATCC 34913, *Fusarium culmorum* ATCC 36017, *Fusarium culmorum* ATCC 36879, *Fusarium culmorum* ATCC 36881, 5 *Fusarium culmorum* ATCC 36886, *Fusarium culmorum* ATCC 44417, *Fusarium culmorum* ATCC 46040, *Fusarium culmorum* ATCC 56088, *Fusarium culmorum* ATCC 56089, *Fusarium culmorum* ATCC 60275, *Fusarium culmorum* ATCC 60362, *Fusarium culmorum* ATCC 62214, *Fusarium culmorum* ATCC 62215, of *Fusarium culmorum* ATCC 64075, of een mutant of een variant daarvan.

10 [0014] Bij zijn meest de voorkeur genietende uitvoeringsvorm voorziet de onderhavige uitvinding in een lipolytisch enzym dat is afgeleid van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94 of een mutant of een variant daarvan. Deze stam is gedeponerd overeenkomstig het Búdapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms formule the Purposes of Patent Procedure at Centraal bureau Voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Nederland, 15 op 25 oktober 1994.

[0015] In een ander aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een biologisch zuivere kweek van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

## 20 Fysisch-chemische eigenschappen

[0016] Bij voorkeursuitvoeringsvormen kan het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding worden gekenmerkt doordat het een of meer van de volgende fysisch-chemische eigenschappen heeft.

25 [0017] Het enzym heeft een molecuulgewicht van 28,4 kDa, zoals bepaald door middel van massaspectrometrie.

## Bereiding van het lipolytische enzym

30 [0018] Het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding kan worden bereid door middel van het kweken van een stam van *Fusarium culmorum* in een geschikt voedingsmedium, welk koolstof- en stikstofbronnen en anorganische zouten bevat, gevolgd door het winnen van het lipase. Bij een voorkeursuitvoeringsvorm is de lipase

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

producerende stam de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94 of een mutant of een variant daarvan.

[0019] Het lipolytische enzym kan ook worden verkregen door middel van recombinant DNA technologie door middel van werkwijzen, welke op zich in de huidige stand der techniek bekend zijn, b.v. het isoleren van een DNA fragment dat codeert voor het lipase, het combineren van het DNA fragment met een geschikt expressiesignaal (s) in een geschikte vector, het introduceren van de vector of delen daarvan in een geschikte gastheer, ofwel als een autonoom replicerend plasmide of geïntegreerd in het chromosoom, het kweken van het gastheer organisme onder omstandigheden die leiden tot de expressie van het lipase en het winnen van het lipase uit het kweekmedium.

[0020] Bij voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding is het gastheer organisme van bacteriële oorsprong, bij voorkeur een stam van *Escherichia coli*, of een stam van *Bacillus*, of een stam van *Streptomyces*, of van schimmeloorsprong, bij voorkeur een stam van *Aspergillus*, een stam van *Neurospora*, een stam van *Fusarium*, of een stam van *Trichoderma*, of een gistcel, bij voorkeur een stam van *Saccharomyces*, of een stam van *Kluyveromyces*, of een stam van *Hansenula*, of een stam van *Pichia*.

[0021] Na het kweken kan het lipolytische enzym worden gewonnen en worden gezuiverd uit het kweekmedium door middel van gebruikelijke werkwijzen, zoals hydrofobe kolomchromatografiemethoden, ionenuitwisselingschromatografie of combinaties daarvan.

#### Lipolytische activiteit

[0022] De lipolytische activiteit kan worden bepaald met gebruik van tributyrine als substraat. Deze werkwijze is gebaseerd op de hydrolyse van tributyrine door middel van het enzym en de consumptie van de alkalische stof wordt gemeten als een functie van tijd.

[0023] Een Lipase Eenheid (U) wordt gedefinieerd als de hoeveelheid enzym, welke onder standaard omstandigheden (dat wil zeggen bij 30 °C; pH 7,0; en tributyrine als substraat) 1 µmol titreerbaar boterzuur per minuut vrijmaakt. Arabische gom wordt gebruikt als emulgator.

[0024] Een folder AF 95/5, welk deze analytische werkwijze in meer detail beschrijft is op verzoek verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S Denemarken, welke folder hierin door referentie is opgenomen.

## 5 Detergens samenstellingen

[0025] Het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding kan normaliter een substantie zijn van een detergens samenstelling. Als zodanig kan het worden toegevoegd aan de detergens samenstelling in de vorm van een niet stuivend granulaat, een gestabiliseerde vloeistof, of een beschermd enzym. Niet stuivende granulaten kunnen b.v. worden vervaardigd zoals beschreven in de Amerikaanse octrooischriften 4.106.991 en 4.661.452 (beide op naam van Novo Industri A/S) en kunnen eventueel worden bekleed door middel van werkwijze die bekend zijn in de huidige stand der techniek. Voorbeelden van wasachtige bekledingsmaterialen zijn poly(ethyleenoxide) producten (polyethyleenglycol, PEG) met gemiddelde molecuulgewichten van 1000 tot 20000; geethoxylerde nonylfenolen, welke 16 tot 50 ethyleenoxide-eenheden hebben; geethoxylerde vetzuuralcoholen, waarin de alcohol van 12 tot 20 koolstofatomen bevat en waarin er 15 tot 80 ethyleenoxide-eenheden zijn; vetzuuralcoholen; vetzuren; en mono- en di- en triglyceriden van vetzuren. Voorbeelden van filmvormende bekledingsmaterialen die geschikt zijn voor de toepassing door middel van gefluïdiseerd bed technieken worden gegeven in het Britse octrooischrift GB 1483591. Vloeibare enzympreparaten kunnen b.v. worden gestabiliseerd door middel van de toevoeging van een polyol zoals propyleenglycol, een suiker of een suikeralcohol, melkzuur of boorzuur, overeenkomstig gebruikelijke werkwijzen. Andere enzymstabilisatoren zijn algemeen bekend in de huidige stand der techniek. Beschermdes enzymen kunnen worden bereid overeenkomstig de werkwijze beschreven in het Europese octrooischrift EP 238.216.

[0026] De detergens samenstelling van de onderhavige uitvinding kan in elke geschikte vorm, b.v. als poeder, granulaat, pasta of vloeistof zijn. Een vloeibaar detergens kan waterig zijn, normaliter bevat het tot en met 70% water en 0-30% organisch oplosmiddel, of het kan niet-waterig zijn.

[0027] De detergens samenstelling omvat een of meer oppervlakte-actieve stoffen, welke elk van anionisch, niet ionisch, kationisch of zwitterionisch kunnen zijn. Het detergens zal normaliter 0-50% van een anionische oppervlakte-actieve stof zoals line-



air alkylbenzeensulfonaat (LAS), alfa-alkeensulfonaat (AOS), alkylsulfaat (vetzuuralcoholsulfaat) (AS), alcoholethoxysulfaat (AEOS of AES), secundaire alkaansulfonaten (SAS), alfa-sulfo vetzuurmethylesters, alkyl- of alkenylsuccinezuur of zeep bevatten. Het kan ook 0-40% niet ionische oppervlakte-actieve stoffen bevatten, zoals alcoholethoxylaar (AEO of AE), gecarboxyleerde alcoholethoxylaten, nonylfenoethoxylaar, alkylpolyglycoside, alkyl-dimethylamineoxide, geethoxyleerde vetzuurmonoethanolamide, vetzuurmonoethanolamide, of polyhydroxyalkyl vetzuuramide (b.v. zoals beschreven in WO 92/06154).

[0028] De detergens samenstelling kan bovendien een of meer andere enzymen bevatten die normaliter in detergens samenstellingen worden gebruikt, zoals een amylase, een cutinase, een protease, een cellulase, een peroxidase en/of een oxidase.

[0029] Het detergens kan 1-65% van een detergens bouwstof of complexerend middel bevatten, zoals zeoliet, difosfaat, trifosfaat, fosfonaat, citraat, nitrilotriazijnzuur (NTA), ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA), diethyleentriaminepentaazijnzuur (DTMPA), alkyl of alkenylsuccinezuur, oplosbare silicaten of gelaagde silicaten (b.v. SKS-6 van Hoechst). Het detergens kan ook zonder bouwstoffen zijn, dat wil zeggen wezenlijk vrij van detergens bouwstof.

[0030] Het detergens kan een of meer polymeren bevatten. Voorbeelden zijn carboxymethylcellulose (CMC), poly(vinylpyrrolidon) (PVP), polyethyleenglycol (PEG), poly(vinylalcohol) (PVA), polycarboxylaten zoals polyacrylaten, maleïne/acrylzuur copolymeren en lauryl methacrylaar/acrylzuur copolymeren.

[0031] Het detergens kan een bleeksysteem bevatten, welk een H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bron kan omvatten, zoals perboraat of percarbonaat, welk kan worden gecombineerd met een perzuur vormende bleekmiddel activator zoals tetraacetylethyleendiamine (TAED) of nonanoyloxybenzeensulfonaat (NOBS). Op alternatieve wijze kan het bleeksysteem peroxyzuren van b.v. de amide, imide of sulfonsoort bevatten.

[0032] De enzymen van de detergens samenstelling van de onderhavige uitvinding kunnen worden gestabiliseerd met gebruik van traditionele stabilisatiemiddelen, b.v. een polyol zoals propyleenglycol of glycerol, een suiker of suikeralcohol, melkzuur, boorzuur of een boorzuurderivaat zoals b.v. een aromatische boraateter en de samenstelling kan worden geprepareerd zoals beschreven in b.v. WO 92/19709 en WO 92/19708.

[0033] Het detergens kan ook andere gebruikelijke detergens ingrediënten bevatten zoals b.v. stofconditioners, waaronder kleien, schuimversterkers, uitzakonderdrukkers, anticorrosiemiddelen, vuil suspenderende middelen, antivuil redepositiemiddelen, kleurstoffen, bacteriociden, witmakers of parfum.

5 [0034] De pH (gemeten in een oplossing in water bij de gebruikconcentratie) zal normaliter neutraal of alkalisch zijn, b.v. in het bereik van 7-11.

[0035] Kenmerkende vormen van detergens samenstellingen binnen de omvang van de onderhavige uitvinding omvatten:

10 1) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	7-12 %
Alcoholethoxysulfaat (b.v. C <sub>12-18</sub> alcohol, 1-2 EO) of alkylsulfaat (b.v. C <sub>16-18</sub> )	1-4 %
Alcoholethoxylaat (b.v. C <sub>14-15</sub> alcohol, 7 EO)	5-9 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14-20 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	2-6 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	15-22 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-6 %
Natriumcitraat/citroenzuur (als C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0-15 %
Natriumperboraat (als NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	11-18 %
TAED	2-6 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. maleïne/acrylzuur copolymeer, PVP, PEG)	0-3 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. uitzakonderdrukkers, parfum, witmaker, fotobleekmiddel)	0-5 %

15 2) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	6-11 %
Alcoholethoxysulfaat (b.v. C <sub>12-18</sub> alcohol, 1-2 EO) of alkylsulfaat (b.v. C <sub>16-18</sub> )	1-3 %
Alcoholethoxylaat (b.v. C <sub>14-15</sub> alcohol, 7 EO)	5-9 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15-21 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	24-34 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4-10 %
Natriumcitraat/citroenzuur (als C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0-15 %
Natriumperboraat (als NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	11-18 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. maleïne/acrylzuur copolymeer, PVP, PEG)	1-6 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. uitzakonderdrukkers, parfum)	0-5 %

3) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

5

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	5-9 %
Alcoholethoxylaat (b.v. C <sub>14-15</sub> alcohol, 7 EO)	7-14 %
Zeep als vetzuur (b.v. C <sub>18-22</sub> vetzuur)	1-3 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10-17 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	3-9 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	23-33 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-4 %
Natriumperboraat (als NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	8-16 %
TAED	2-8 %
Fosfonaat (b.v. EDTMPA)	0-1 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. maleïne/acrylzuur copolymeer, PVP, PEG)	0-3 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. uitzakonderdrukkers, parfum, witmaker)	0-5 %

4) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

EU 0 784 674 B1

NZAS-0020708

BEST AVAILABLE COPY

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	8-12 %
Alcoholethoxylaat (b.v. C <sub>14-15</sub> alcohol, 7 EO)	10-25 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14-22 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	1-5 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	25-35 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-10 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. maleïne/acrylzuur copolymeer, PVP, PEG)	1-3 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. uitzakonderdrukkers, parfum)	0-5 %

## 5) Een waterige vloeibare detergens samenstelling omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	15-21 %
Alcoholethoxylaat (b.v. C <sub>12-15</sub> alcohol, 7 EO of C <sub>12-15</sub> alcohol, 5 EO)	12-18 %
Zeep als vetzuur (b.v. oliezuur)	3-13 %
Alkenylsuccinezuur (C <sub>12-14</sub> )	0-13 %
Aminoethanol	8-18 %
Citroenzuur	2-8 %
Fosfonaat	0-3 %
Polymeren (b.v. PVP, PEG)	0-3 %
Boraat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0-2 %
Ethanol	0-3 %
Propyleenglycol	8-14 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. disperseermiddelen, uitzakonderdrukkers, parfum, witmaker)	0-5 %

5

EU 0 784 674 B1

UNAVAILABLE COPY

6) Een waterige gestructureerde vloeibare detergens samenstelling omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	15-21 %
Alcoholethoxylaar (b.v. C <sub>12-15</sub> alcohol, 7 EO of C <sub>12-15</sub> alcohol, 5 EO)	3-9 %
Zeep als vetzuur (b.v. oliezuur)	3-10 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	14-22 %
Kaliumcitraat	9-18 %
Boraat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0-2 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. PVP, PEG)	0-3 %
Verankerende polymeren zoals b.v. lauryl methacrylaar/acrylzuur copolymeer, molaire verhouding 25:1; molecuulgewicht 3800	0-3 %
Glycerol	0-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. disperseermiddelen, uitzakonderdruckers, parfum, witmaker)	0-5 %

5 7) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

Vetzuuralcoholsulfaat	5-10 %
Geethoxyleerd vetzuur monoethanolamide	3-9 %
Zeep als vetzuur (b.v. C <sub>18-22</sub> vetzuur)	0-3 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5-10 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	1-4 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	20-40 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2-8 %
Natriumperboraat (als NaBO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O)	12-18 %
TAED	2-7 %
Polymeren (b.v. maleïne/acrylzuur copolymeer, PEG)	1-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. witmaker, uitzakonderdruckers, parfum)	0-5 %

BEST AVAILABLE COPY

## 8) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	8-14 %
Geethoxyleerd vetzuur monoethanolamide	5-11 %
Zeep als vetzuur (b.v. C <sub>18-22</sub> vetzuur)	0-3 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	4-10 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	1-4 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	30-50 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	3-11 %
Natriumcitraat (als C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	5-12 %
Polymeren (b.v. PVP, maleïne/acrylzuur copolymeer, PEG)	1-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. witmaker, parfum)	0-5 %

## 9) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, omvattend

5

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	6-12 %
Niet ionische oppervlakte-actieve stof	1-4 %
Zeep als vetzuur (b.v. C <sub>18-22</sub> vetzuur)	2-6 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14-22 %
Zeoliet (als NaA 1 SiO <sub>4</sub> )	18-32 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5-20 %
Natriumcitraat (als C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	3-8 %
Natriumperboraat (als NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4-9 %
Bleekactivator (b.v. NOBS of TEAD)	1-5 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymeren (b.v. polycarboxylaat of PEG)	1-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. witmaker, parfum)	0-5 %

BEST AVAILABLE COPY

## 10) Een waterige vloeibare detergens samenstelling omvattend

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	15-23 %
Alcoholethoxysulfaat (b.v. C <sub>12-15</sub> alcohol, 2-3 EO)	8-15 %
Alcoholethoxylaate (b.v. C <sub>12-15</sub> alcohol, 7 EO, of C <sub>12-15</sub> alcohol, 5 EO)	3-9 %
Zeepp als vetzuur (b.v. laurinezuur)	0-3 %
Aminoethanol	1-5 %
Natriumcitraat	5-10 %
Natriumsulfaat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5-10 %
Hydrotroop (b.v. natriumtolueensulfonaat)	2-6 %
Boraat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0-2 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Ethanol	1-3 %
Propyleenglycol	2-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. uitzakonderdrukkers, parfum, witmaker)	0-5 %

## 11) Een waterige vloeibare detergens samenstelling omvattend

5

Lineair alkylbenzeensulfonaat (berekend als zuur)	20-32 %
Alcoholethoxylaate (b.v. C <sub>12-15</sub> alcohol, 7 EO, of C <sub>12-15</sub> alcohol, 5 EO)	6-12 %
Aminoethanol	2-6 %
Citroenzuur	8-14 %
Boraat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	1-3 %
Polymeer (b.v. maleine/acrylzuur copolymeer, verankerend polymeer zoals b.v. lauryl methacrylaate/acrylzuur copolymeer)	0-3 %
Glycerol	3-8 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. hydrotropen, disperseermiddelen, parfum, witmaker)	0-5 %

12) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

Anionische oppervlakte-actieve stof (lineair alkylbenzeensulfonaat, alkylsulfaat, alfa-alkeensulfonaat, alfa-sulfo vetzuurmethylesters, alkaansulfonaten, zeep)	25-40 %
Niet ionische oppervlakte-actieve stof (b.v. alcoholethoxylaar)	1-10 %
Natriumcarbonaat (als $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	8-25 %
Oplosbaar silicaat (als $\text{Na}_2\text{O}$ , 2 $\text{SiO}_2$ )	5-15 %
Natriumsulfaat (als $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	0-5 %
Zeoliet (als $\text{NaA}$ 1 $\text{SiO}_4$ )	15-28 %
Natriumperboraat (als $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0-20 %
Bleekactivator (TAED of NOBS)	0-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. parfum, witmaker)	0-5 %

5 13) Detergens preparaten zoals beschreven in 1)-12), waarbij al of een deel van het lineaire alkylbenzeensulfonaat is vervangen door ( $\text{C}_{12-18}$ )alkylsulfaat.

14) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

10.

( $\text{C}_{12-18}$ )alkylsulfaat	9-15 %
Alcoholethoxylaar	3-6 %
Polyhydroxyalkyl vetzuuramide	1-5 %
Zeoliet (als $\text{NaA}$ 1 $\text{SiO}_4$ )	10-20 %
Gelaagd disilicaat (b.v. SK56 van Hoechst)	10-20 %
Natriumcarbonaat (als $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	3-12 %
Oplosbaar silicaat (als $\text{Na}_2\text{O}$ , 2 $\text{SiO}_2$ )	0-6 %
Natriumcitraat	4-8 %
Natriumpercarbonaat	13-22 %
TAED	3-8 %
Polymeren (b.v. carboxylaten en PVP)	0-5 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. witmakers, fotobleekmiddelen, parfum, uitzakonderdrukkers)	0-5 %

EU 0 784 674 B1

NOT AVAILABLE COPY



15) Een detergens samenstelling geprepareerd als een granulaat, welk een bulkdichtheid heeft van ten minste 600 g/l, omvattend

(C <sub>12-18</sub> )alkylsulfaat	4-8 %
Alcoholethoxylaar	11-15 %
Zeep	1-4 %
Zeoliet MAP of zeoliet A	35-45 %
Natriumcarbonaat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2-8 %
Oplosbaar silicaat (als Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	0-4 %
Natriumpercarbonaat	13-22 %
TAED	1-8 %
Carboxymethylcellulose	0-3 %
Polymeren (b.v. carboxylaten en PVP)	0-3 %
Enzymen (berekend als zuiver enzymeiwit)	0,0001-0.1 %
Minder belangrijke ingrediënten (b.v. witmakers, fosfonaat, parfum)	0-3 %

- 5 16) Detergens samenstelling zoals beschreven in 1) –tot 15) welke een gestabiliseerd of ingekapseld perzuur bevatten, ofwel als een extra toevoeging of als een substituent voor reeds beschreven bleeksystemen.
- 10 17) Detergens samenstellingen zoals beschreven in 1), 3), 7), 9) en 12), waarbij perboraat wordt vervangen door percarbonaat.
- 15 18) Detergens samenstelling zoals beschreven in 1), 3), 7), 9), 12), 14) en 15), welke bovendien een mangaankatalysator bevatten. De mangaankatalysator kan er b.v. een zijn zoals beschreven in "Efficient manganese catalysis formule low temperature bleaching", Nature 369, 1994, pagina's 637-639.
- 20 19) Detergens samenstelling geprepareerd als een niet waterige detergensvloeistof, omvattend een vloeibare niet ionische oppervlakte-actieve stof zoals b.v. lineair gealkoxylerd primair alcohol, een opbouwsysteem (b.v. fosfaat), enzym en alkalische stof. Het detergens kan ook anionische oppervlakte-actieve stoffen en/of een bleekstelsel omvatten.

EU 0 784 674 B1

NOT AVAILABLE COPY

[0036] Het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding kan worden ingebracht in concentraties welke normaliter worden toegepast in detergenten. Het wordt nu overwogen dat bij de detergens samenstelling van de onderhavige uitvinding het lipase kan worden toegevoegd in een hoeveelheid overeenkomstig met 0,001-100 mg lipase per liter waswater.

### VOORBEELDEN

[0037] De uitvinding wordt verder geïllustreerd met verwijzing naar de volgende voorbeelden, welke op geen enkele wijze bedoeld zijn om de omvang van de uitvinding zoals deze in de conclusies wordt beschreven te beperken.

#### Voorbeeld I

#### 15 Kweekvoorbeeld

[0038] Entkweken van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94 werden vervaardigd in 500 ml schudflessen, welke 100 ml van de volgende samenstelling bevatten:

Maisweekvocht (gedroogd)	12 g/l
Glucose	24 g/l

20

[0039] Aan elke fles werd 0,5 g  $\text{CaCO}_3$  en 0,5 ml olie toegevoegd.

[0040] De pH werd bijgesteld naar 5,5 voordat er werd geautoclaveerd.

[0041] Na 3 dagen bij 26 °C en 250 tpm, werd 5 ml van elk van de entkweken geïnoculeerd in schudflessen, welke 100 ml van het volgende medium bevatten:

25

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Peptidase, Sheffield Products	4 g/l
Gistextract, Difco 0127	3 g/l
Vleesextract, Difco 0126	1,5 g/l
Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olijfolie, Sigma	10 g/l

EU 0 784 674 B1

NOT AVAILABLE COPY

[0042] De pH werd bijgesteld naar 7,3-7,4 voordat er werd geautoclaveerd.

[0043] Het kweken vond plaats gedurende 9 dagen bij 26 °C en 250 tpm. De kweken werden gecentrifugeerd en de supernatanten werden op een hydrofobe matrix gezuiverd (TSK gel Butyl ToyoPearl 650 C kolom, verkrijgbaar bij Tosoh Corporation, Japan) en toegepast in verdere studies.

## Voorbeeld 2

### 10 Karakteriseringsvoorbeeld

#### pH optimum

[0044] Het supernatant dat die werd verkregen overeenkomstig Voorbeeld 1 werd onderworpen aan de LU werkwijze voor het bepalen van lipaseactiviteit zoals hierboven beschreven en de verhouding tussen pH en lipaseactiviteit van het lipolytische enzym van de onderhavige uitvinding werd bij 30 °C bepaald in het bereik van pH 6 tot pH 10.

[0045] De resultaten van deze karakterisering worden weergegeven in Figuur 1. Het lipolytische enzym heeft een pH optimum in het bereik van, ongeveer pH 7 tot ongeveer pH 9, meer in het bijzonder ongeveer pH 8.

#### Bepaling van het molecuulgewicht

[0046] Massaspectrometrie werd uitgevoerd met gebruik van matrixondersteunde laser desorptie ionisatie time-of-flight (MALDI-TOF) massaspectrometrie in een VG Analytical ToFSpec. Ten behoeve van massaspectrometrie werd 2 µl monster, zoals verkregen volgens Voorbeeld 1 werd gemengd met 2 µl verzadigde matrixoplossing ( $\alpha$ -cyaan-4-hydroxykaneelzuur in 0,1 % TFA:acetonitril (70:30)) en werd 2 µl van het mengsel op de doelplaat gespot. Voor de introductie in de massaspectrometer werd het oplosmiddel door middel van verdamping verwijderd. Het monster werd gedesorbeerd en geïoniseerd door middel van 4 ns laserpulsen (337 nm) bij een drempelwaarde laser-  
vermogen en versneld in de veldvrije vluchtbuis door middel van een versnellingspan-

EU 0 784 674 B1

NOT AVAILABLE COPY

ning van 25 kV. Ionen werden gedetecteerd door middel van een microkanaalplaat, welke op 1850 V was ingesteld. De spectra werden extern gekalibreerd met eiwitten van een bekende massa.

[0047] Er werd een massa van 28,4 kDa bepaald.

5

#### N-terminale aminozuursequentie

[0048] Met gebruik van standaard werkwijzen voor het verkrijgen en bepalen van de volgorde van peptides [Findlay & Geisow (Eds.) (1989); Protein Sequencing – a practical approach; IRL Press], werden de volgende 25 N-terminale aminozuurresiduen van het lipolytische enzym geïdentificeerd, zoals weergegeven door SEQ ID NO:1 (waarbij Xaa een onbekend aminozuurresidu weergeeft):

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-  
Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

15

#### Voorbeeld 3

#### Lipolytische activiteit

20

[0049] Met gebruik van een monolaaginrichting (KSV-5000, KSV Instruments, Finland) werd het aangetoond dat het lipolytische enzym van *Fusarium culmorum* aanzienlijk verhoogde activiteit heeft ten opzichte van dicaprine in de aanwezigheid van lange keten alcoholethoxylaten.

25

[0050] Een gemengde monolaag in een goed gedefinieerde samenstelling, vervaardigd uit een diglyceride substraat en een monobestanddeel alcoholethoxylaat (AEO: Heptaethyleenglycol mono-octadecylether) wordt uitgespreid op een subfase in water (10 mM glycine, pH 10,0, 0,1 M EDTA, 25 °C). de oppervlaktedruk werd ingesteld op de gewenste waarde en een goed gedefinieerde hoeveelheid enzym (10 LU, lipase-eenheden zoals hierboven gedefinieerd) werd in de subfase geïnjecteerd. Lipolytische activiteit manifesteert zich door middel van de snelheid van een mobiele barrière die de monolaag samendrukt teneinde een constante oppervlaktespanning te houden wanneer onoplosbare substraatmoleculen worden gehydrolyseerd naar meer wateroplosbare re-

30

EU 0 784 674 B1

actieproducten. Met gebruik van deze test werden lipolytische enzymen gediscrimineerd door middel van een parameter  $\beta$  welke de uiteindelijke oppervlakte-fractie aan substraat (dicaprine) aangeeft, welke ongehydrolyseerd blijft door het enzym zodra de lipolytische activiteit stopt.

- 5 [0051] Op deze wijze werd het lipase van de onderhavige uitvinding vergeleken met een *Aspergillus* lipase, welk normaliter werd gebruikt in detergenten (Lipolase™, verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S, Denemarken). De resultaten worden in de hieronder staande Tabel 1 weergegeven.

10 Tabel 1

Verbeterde tolerantie van lipolytische enzym uit <i>Fusarium culmorum</i> vergeleken met Lipolase™	
	$\beta$ (30 mN/m)*
Lipolase™	57 %
<i>Fusarium culmorum</i> lipase	25 %

\* toegepaste oppervlaktetensioning

- 15 [0052] Deze resultaten tonen aan dat indien vergeleken met Lipolase™, het lipolytische enzym dat werd verkregen uit *Fusarium culmorum* aanzienlijk efficiënter is indien alcoholethoxylaten aanwezig zijn in de substraatfase.

#### Voorbeeld 4

#### 20 Substraataffiniteit

- 25 [0053] Een werkwijze is ontwikkeld welke is gericht op een eenvoudige vergelijking van het vermogen van lipolytische enzymen om te accumuleren op of in een substraatfase (olijfolie) bij een alkalische pH (pH 9,0) en in de aanwezigheid van een niet ionische oppervlakte-actieve stof Dobanol 25-7 (2500 ppm) in de waterige fase.

Werkwijze

[0054]

5

1. Twee identieke bufferoplossingen (5 ml) worden bereid in 20 ml afsluitbare flesjes, ("Monster" (s) en "referentie" (r)).
2. Enzym wordt toegevoegd aan "Monster" en "Referentie" en de lipaseconcentratie wordt bepaald (X LU/ml).
- 10 3. Olijfolie wordt toegevoegd aan het "Monster" en beide lipaseoplossingen worden heftig geschud. Incubatie overnacht bij 4 °C.
4. Overgebleven lipaseconcentratie in de waterige fasen wordt bepaald na de incubatie (Y, LU/ml; i = r, s).

15 Samenvatting van de incubatieomstandigheden

[0055]

Buffer	100 mM glycine.
pH	9,0.
Substraat	olijfolie (5 ml).
Temperatuur	4 °C.
Lipase activiteit	5-10 LU/ml.
incubatie	overnacht (24-26 uur).

20 Evaluatie van gegevens

[0056] Het resultaat wordt berekend door middel van het vergelijken van het activiteitsverlies na incubatie in de waterige fase in contact met olijfolie ten opzichte van het activiteitsverlies in de waterige fase in de afwezigheid van olijfolie:

25

$$\alpha = Y_s/Y_r \text{ (zie boven)}$$

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

[0057]. De resultaten worden in de onderstaande Tabel 2 getoond.

Tabel 2

Substraataffiniteit	
Lipolytische enzym	$\alpha$ (%)
Lipolase <sup>TM</sup>	99 %
<i>Fusarium culmorum</i> lipase	99 %

BEST AVAILABLE COPY

## Sequentielijst

[0058]

## 5 (2) Informatie voor SEQ ID NO: 1:

## (i) Sequentiekenmerken:

(A) lengte: 25 aminozuren

(B) Soort: aminozuur

10 (C) Gestrengdheid: enkel

(D) Topologie: lineair

(ii) molecuulsoort: peptide

(v) fragmentsoort: N-terminal

15 (vi) oorspronkelijke bron:

(A) organisme: Fusarium culmorum

(B) stam: CBS 513.94

20 (ix) kenmerk:

(A) Naam/Sleutel: CDS

(B) Locatie: 101 .. 1433

25 (xi) Sequentiebeschrijving: SEQ ID NO: 1:

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-

1 5 10 15

30 Gln-His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

20 25

EU 0 784 674 B1

AVAILABLE COPY



## INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>3</u> , line s <u>9-14</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT <span style="float: right;">Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>	
Name of depositary institution <b>CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES</b>	
Address of depositary institution (including postal code and country) <b>Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Barn, Nether- land</b>	
Date of deposit <u>25 October 1994</u>	Accession Number <b>CBS 513.94</b>
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) <span style="float: right;">This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>	
In respect of those designations in which a European and/or Australian patent is sought, during the pendency of the patent application a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC / Regulation 3.25 of Australia Statutory Rules 1991 No 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer <u>A. G. Henriksson</u> Anne-Grethe Henriksson Head Clerk	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1992)

EU 0 784 674 B1

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0020722

Conclusies

1. Lipolytische enzym, welk:
  - a) is afgeleid van een stam van *Fusarium culmorum*,
  - 5 b) een pH optimum heeft in het bereik van ongeveer 7 tot ongeveer 9, indien bepaald bij 30 °C met tributyrine als substraat en
  - c) de volgende N-terminale aminozuursequentie heeft:  
Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-
- 10 2. Lipolytische enzym volgens conclusie 1, welk is afgeleid van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94.
- 15 3. Lipolytische enzym volgens conclusie 1 of 2, welk een molecuulgewicht heeft van 28,4 kDa zoals bepaald door middel van massaspectrometrie.
- 20 4. Werkwijze voor de bereiding van een lipolytische enzym volgens een van de conclusies 1-3, welke werkwijze het kweken omvat van een lipaseproducerende stam van *Fusarium culmorum* in een geschikt voedingsmedium, welk koolstof- en stikstofbronnen en andere anorganische zouten bevat, gevolgd door het winnen van het lipolytische enzym.
- 25 5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij de lipaseproducerende stam de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94 is.
- 30 6. Werkwijze voor de bereiding van een lipolytische enzym volgens een van de conclusie 1-3, welke werkwijze het isoleren omvat van een DNA fragment, welk codeert voor het lipolytische enzym; het combineren van het DNA fragment met een geschikt expressiesignaal in een geschikte plasmidevector; het introduceren van de plasmidevector in een geschikte gastheer, ofwel als een autonoom replicerend plasmide of geïntegreerd in het chromosoom; het kweken van het gastheer organisme onder omstandigheden die leiden tot de expressie van het lipolytische enzym; en het winnen van het enzym uit het kweekmedium.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarin het gastheer organisme van bacteriële oorsprong is, bij voorkeur een stam van *Escherichia coli*, of een stam van *Bacillus*, of een stam van *Streptomyces*, of van schimmeloorsprong, bij voorkeur een stam van *Aspergillus*, een stam van *Neurospora*, een stam van *Fusarium*, of een stam van *Trichoderma*, of een gistcel, bij voorkeur een stam van *Saccharomyces*, of een stam van *Kluyveromyces*, of een stam van *Hansenula*, of een stam van *Pichia*.
8. Detergens samenstelling omvattend het lipolytische enzym van een van de conclusies 1-3.
9. Detergens samenstelling volgens conclusie 8, welke verder een of meer andere enzymen bevat, in het bijzonder proteases, amylases, cellulases, oxidases en/of peroxidases.
10. Detergens toevoeging omvattend het lipolytische enzym van een van de conclusies 1-3, voorzien in de vorm van een granulaat, bij voorkeur een niet stuivend granulaat, een vloeistof, in het bijzonder een gestabiliseerde vloeistof, een slurry of een beschermd enzym.
11. Biologisch zuivere kweek van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

=====

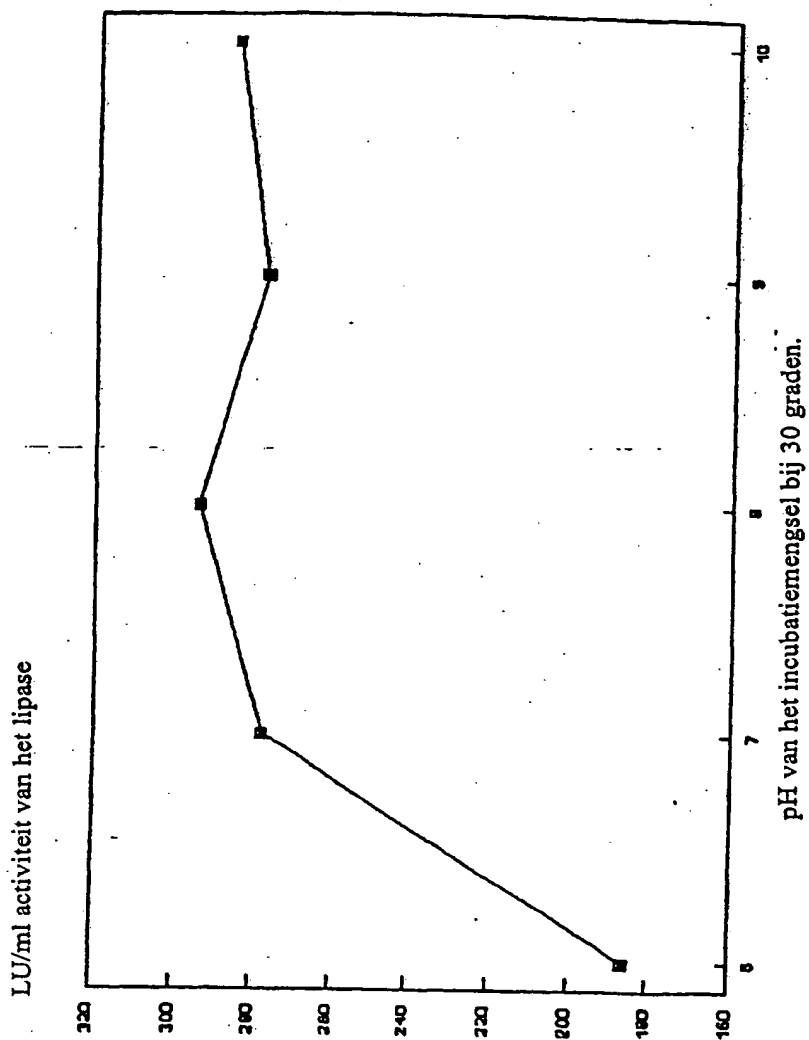


FIG. 1